



日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

CFO 16229 US / K  
03500.016229  
Appn. No. 10/084,167

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日  
Date of Application:

2001年 2月28日

出願番号  
Application Number:

特願2001-055304

[ ST.10/C ]:

[ JP 2001-055304 ]

出願人  
Applicant(s):

キヤノン株式会社

RECEIVED

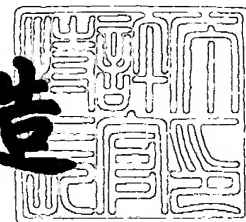
NOV 29 2002

TECH CENTER 1600/2900

2002年 3月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2002-3019154

【書類名】 特許願

【整理番号】 4396010

【提出日】 平成13年 2月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 7/42  
C08G 63/06

【発明の名称】 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットを含む新規なポリエステル、およびその生産方法

【請求項の数】 16

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社 社内

【氏名】 鈴木 智博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社 社内

【氏名】 見目 敬

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社 社内

【氏名】 今村 剛士

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社 社内

【氏名】 須川 悦子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社 社内

【氏名】 野本 毅

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会  
社内

【氏名】 本間 務

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会  
社内

【氏名】 矢野 哲哉

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【プルーフの要否】 要

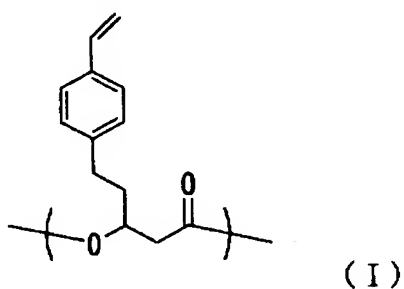
【書類名】 明細書

【発明の名称】 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットを含む新規なポリエステル、およびその生産方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリヒドロキシアリカノエート型のポリエステルであって、下記化学式(I)：

【化1】

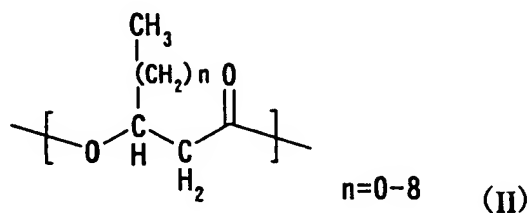


で示される3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットを含むポリエステル。

【請求項2】 化学式(I)で示される3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットの含有率が、1ユニット%以上であることを特徴とする請求項1に記載のポリエステル。

【請求項3】 化学式(I)で示される3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニット以外に、下記化学式(II)：

【化2】



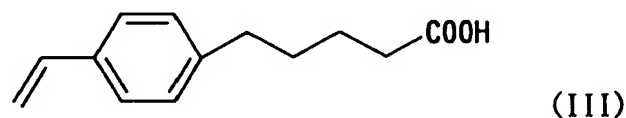
(式中、nは0～8の整数を表す)で示される3-ヒドロキシアリカン酸ユニ

ットを含むことを特徴とする請求項 1 に記載のポリエステル。

【請求項 4】 数平均分子量は、3 0 0 0 ～ 1 0 0 0 0 0 の範囲にあることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のポリエステル。

【請求項 5】 下記化学式 (III) :

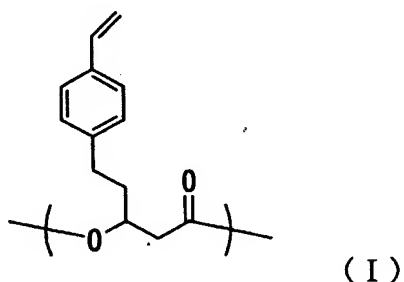
【化 3】



で示される 5 - ( 4 - ビニルフェニル ) 吉草酸を原料とし、  
前記化学式 (III) の化合物を含む培地中で、ポリヒドロキシアルカノエートの  
産生能を有する微生物を培養して、

下記化学式 (I) :

【化 4】



で示される 3 - ヒドロキシ - 5 - ( 4 - ビニルフェニル ) 吉草酸ユニットを含む  
ポリエステルを前記微生物に産生させることを特徴とする微生物を用いたポリエ  
ステルの生産方法。

【請求項 6】 前記化学式 (III) の化合物に加えて、ペプチド類をも含む  
培地中で、前記微生物を培養することを特徴とする請求項 5 に記載のポリエス  
テルの生産方法。

【請求項 7】 培地中に含める前記ペプチド類として、ポリペプトンを用いることを特徴とする請求項 6 に記載のポリエステルの生産方法。

【請求項 8】 前記化学式 (III) の化合物に加えて、有機酸をも含む培地中で、前記微生物を培養することを特徴とする請求項 5 に記載のポリエステルの生産方法。

【請求項 9】 培地中に含める前記有機酸として、ピルビン酸、オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸、ならびにこれら有機酸の塩からなる群より選択される 1 つ以上の有機酸またはその塩を用いることを特徴とする請求項 8 に記載のポリエステルの生産方法。

【請求項 10】 前記化学式 (III) の化合物に加えて、アミノ酸をも含む培地中で、前記微生物を培養することを特徴とする請求項 5 に記載のポリエステルの生産方法。

【請求項 11】 培地中に含める前記アミノ酸として、グルタミン酸、アシパラギン酸、ならびにこれらアミノ酸の塩からなる群より選択される 1 つ以上のアミノ酸またはその塩を用いることを特徴とする請求項 10 に記載のポリエステルの生産方法。

【請求項 12】 前記化学式 (III) の化合物に加えて、糖類をも含む培地中で、前記微生物を培養することを特徴とする請求項 5 に記載のポリエステルの生産方法。

【請求項 13】 培地中に含める前記糖類として、グルコース、フルクトース、マンノース、マルトース、セロビオース、ラクトース、スクロースからなる群より選択される 1 つ以上の糖類を用いることを特徴とする請求項 12 に記載のポリエステルの生産方法。

【請求項 14】 前記化学式 (III) の化合物を含む培地中で、前記微生物を培養し、前記微生物が産生した前記化学式 (I) で示される 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットを含むポリエステルを微生物細胞から回収する工程を有することを特徴とする請求項 5 ~ 13 のいずれかに記載のポリエステルの生産方法。

【請求項15】 前記微生物として、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物を用いることを特徴とする請求項5～14のいずれかに記載のポリエステルの生産方法。

【請求項16】 前記微生物として、シュードモナス・チコリアイ YN2 株 (*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM BP-7375) を用いることを特徴とする請求項15に記載のポリエステルの生産方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート (PHA) 型のポリエステルと、微生物を利用するその生産方法に関し、より具体的には、構成ユニットとして、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットを含むPHA型のポリエステルと、5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸を原料として、PHAの産生能を有する微生物を利用し、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットを含むPHAを生産方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

これまで、多くの微生物が、ポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) あるいはその他のPHAを生産し、その菌体内に蓄積することが報告されている (「生分解性プラスチックハンドブック」, 生分解性プラスチック研究会編, (株) エヌ・ティー・エス, P178-197 (1995))。これらPHAなどの微生物が産生するポリマーは、従来のプラスチックと同様に、溶融加工等により各種製品の生産に利用することができる。さらに、微生物が産生するポリマー、例えば、PHAなどは、生分解性を有しており、自然界の微生物により完全分解されるという利点を有している。従って、例えば、微生物が産生するPHAは、廃棄した際、従来の多くの合成高分子化合物のように自然環境にそのまま残留し、汚染を引き起こす要因となることがない。また、微生物が産生するPHAは、一般に生体適合性にも優れており、医療用軟質部材等としての応用も期待されている。

【0003】



この微生物産生PHAは、その生産に用いる微生物の種類、ならびに、培地組成、培養条件等により、様々な組成や構造のものとなり得ることも知られている。これまで、主にPHAの物性の改良という観点から、微生物産生PHAの組成や構造の制御を試みる研究がなされてきた。

## 【0004】

微生物産生PHAの組成や構造の制御を目的とする研究の一つとして、近年、ユニット中に芳香環を有するPHAを微生物に生産させる研究が盛んになされている。

## 【0005】

Makromol. Chem., 191, 1957-1965 (1990) 及び Macromolecules, 24, 5256-5260 (1991) には、5-フェニル吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

## 【0006】

Macromolecules, 29, 1762-1766 (1996) には、5-(p-トリル) 吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が3-ヒドロキシ-5-(p-トリル) 吉草酸ユニットを含むPHAを生産することが報告されている。

## 【0007】

Macromolecules, 32, 2889-2895 (1999) には、5-(2,4-ジニトロフェニル) 吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が3-ヒドロキシ-5-(2,4-ジニトロフェニル) 吉草酸ユニット、及び3-ヒドロキシ-5-(p-ニトロフェニル) 吉草酸ユニットを含むPHAを生産することが報告されている。

## 【0008】

Makromol. Chem. Phys., 195, 1665-1672 (1994) には、11-フェノキシウンデカン酸を基質として、シュードモナス

オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸ユニットと3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸ユニットを含むPHAコポリマーを生産することが報告されている。

## 【0009】

特許掲載公報 第2989175号には、3-ヒドロキシ-5- (モノフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (MFP) P) ユニット、あるいは3-ヒドロキシ-5- (ジフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (DFP) P) ユニットからなるホモポリマー；少なくとも、3H5 (MFP) Pユニットあるいは3H5 (DFP) Pユニットを含有するコポリマー；これらのポリマーの産生能を有するシュードモナス・プチダ；シュードモナス属を用いた、前記のポリマーの製造法に関する発明が開示されている。加えて、その発明の効果として、置換基を有する長鎖脂肪酸を資化して、側鎖末端に、1から2個のフッ素原子が置換したフェノキシ基をもつポリマーを合成することができ、また、かかるポリマーは、融点が高い上、良い加工性を保持しつつ、加えて、立体規則性、撥水性を与えることができる点を記載している。

## 【0010】

このユニット中の芳香環上にフッ素置換を有するフッ素置換PHA以外に、ユニット中の芳香環上にシアノ基やニトロ基が置換したPHAの研究もなされている。

## 【0011】

Can. J. Microbiol., 41, 32-43 (1995) 及び Polymer International, 39, 205-213 (1996) には、シュードモナス オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) ATCC 29347株及びシュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) KT 2442株を用いて、オクタン酸と6- (p-シアノフェノキシ) ヘキサン酸あるいは6- (p-ニトロフェノキシ) ヘキサン酸を基質として、3-ヒドロキシ-6- (p-シアノフェノキシ) ヘキサン酸あるいは3-ヒドロキシ-6- (p-ニトロフェノキシ) ヘキサン酸をモノマーユニットとして含むPHAの生産が報告されている。

## 【0012】

これら環状に置換基を持つ芳香環を有するユニットを含むPHAは、融点が高く、加工性も良いという、芳香環に由来するポリマー性状を維持しつつ、芳香環上に存在している置換基に由来する新たな機能も付与された、多機能のPHAとなる。

## 【0013】

また、その一方で、ユニット中にビニル基を有するPHAを基に、生産ポリマーに対して、前記ビニル基を利用する化学変換により任意の官能基をポリマー側鎖に導入し、多機能のPHAを得ることを目的とした研究も盛んに行われている。

## 【0014】

Polymer, 41, 1703-1709 (2000) には、シュードモナス オレオボランス (Pseudomonas oleovorans) を用いて、側鎖にビニル基を有するポリエステルを生産し、ポリエステル分子内のビニル基を酸化することにより、水酸基を側鎖に有するポリエステルを生産したことが報告されている。

## 【0015】

同じく、Macromolecules, 31, 1480-1486 (1998) には、シュードモナス オレオボランス (Pseudomonas oleovorans) を用いて、側鎖にビニル基を有するポリエステルを生産し、ビニル基をエポキシ化することにより、エポキシ基を側鎖に有するポリエステルを生産したことが報告されている。

## 【0016】

更に、Polymer, 40, 3787-3793 (1999) には、同様の方法で得られたエポキシ基を側鎖に有するポリマーを、ヘキサメチレンジアミンとともに加熱することで架橋反応を行い、その反応と、生成物についての解析が報告されている。

## 【0017】

また、Polymer, 35, 2090-2097 (1994) には、ポリエ

ステル側鎖のビニル基を利用し、ポリエステル分子内の架橋反応を行い、ポリエステルの物性を改良した研究に関する報告がなされている。

## 【 0 0 1 8 】

上に紹介した研究からも示されるように、ビニル基は、不飽和炭化水素基であるがゆえに、付加反応などにおける、反応性が高く、様々な官能基の導入や化学的変換を施すことが可能である。また、ポリマーの架橋反応の足がかり、架橋点ともなりうる。従って、PHAを構成するユニット内にビニル基を有することは、ポリマーの機能材料としての応用を考える上で、非常に有用であると言えることができる。

## 【 0 0 1 9 】

## 【発明が解決しようとする課題】

従来報告されている、これらビニル基を有するポリエステルは、いずれもポリエステル骨格に直接結合した側鎖のアルキル鎖の先端にビニル基が置換した構造を有している。しかしながら、アルキル鎖からなる側鎖を有するポリエステルは、一般的に、融点は然程高くなく、溶融加工する上では、熱的性質は必ずしも好ましいものでなく、加工性という観点からは、優れた性状を有している材料は必ずしも多くない。一方、側鎖に芳香環を有するポリエステルは、既に述べたように、一般的に、融点が高く、加工性が良いという特色を有している。

## 【 0 0 2 0 】

すなわち、優れた加工性を有する、新たな機能性ポリマーを開発していく上では、芳香環とビニル基とを側鎖に併せ持つポリエステルの利用が望まれる。残念ながら、これまで、ポリエステルにおいて、芳香環とビニル基のような官能基を側鎖に導入したという報告はなされていない。

## 【 0 0 2 1 】

本発明は前記の課題を解決するもので、本発明の目的は、側鎖上に芳香環及びビニル基を有するポリエステル、特に、生分解性を有するPHA型のポリエステルと、その生産方法を提供することにある。より具体的には、側鎖に、その環上にビニル基が置換している芳香環を有しているPHA型のポリエステルと、それを微生物を利用して生産する方法の提供が、本発明の目的である。

## 【0022】

## 【課題を解決するための手段】

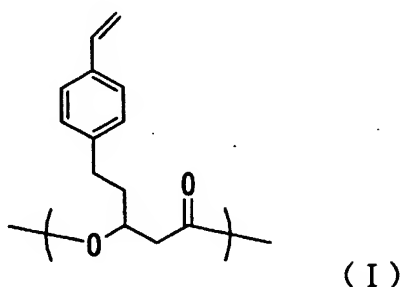
本発明者らは、上記の課題を解決すべく、鋭意研究を進めたところ、直鎖アルカン酸を基質として、対応する3-ヒドロキシアルカン酸ユニットを含むPHAの産生能を有する微生物を用い、特定の培養条件下で、5-(4-ビニルフェニル)吉草酸を含む培地で培養すると、この基質5-(4-ビニルフェニル)吉草酸に存在するビニル基を保持しつつ、その吉草酸骨格の3位にヒドロキシ基の導入がなされた、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットを含むPHA型ポリエステルを生産することを見出した。加えて、前記3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットを含むPHA型ポリエステルには、さらに、3-ヒドロキシアルカン酸ユニットが含まれることがあるが、培養条件を選択すると、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットの含有比率を極めて高くすることも見出した。本発明者らは、前記知見に加えて、微生物を利用して生産可能な、かかる3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットを含むPHA型ポリエステルは、目的とする融点が高く、加工性も良いという加工特性をも保持することを確認し、本発明を完成するに至った。

## 【0023】

すなわち、本発明のポリエステルは、ポリヒドロキシアルカノエート型のポリエステルであって、下記化学式(I)：

## 【0024】

## 【化5】



で示される 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットを含むポリエステルである。少なくとも、化学式 (I) で示される 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットの含有率が、1ユニット%以上であるポリエステルである。

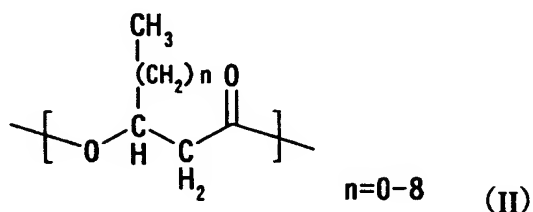
【0025】

本発明のポリエステルは、場合によっては、化学式 (I) で示される 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニット以外に、下記化学式 (II)

:

【0026】

【化 6】



(式中、nは0～8の整数を表す)で示される 3-ヒドロキシアルカン酸ユニットを含むことを特徴とするポリエステルであってもよい。

【0027】

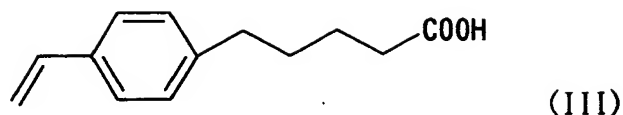
上に述べた、本発明のポリエステルでは、数平均分子量は、3000～100000の範囲にあることを特徴とするポリエステルとすることができる。

【0028】

加えて、本発明は、上記の 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットを含む PHA 型ポリエステルを微生物を利用して生産する方法をも提供しており、すなわち、本発明の微生物を用いたポリエステルの生産方法は、下記化学式 (III) :

【0029】

【化 7】

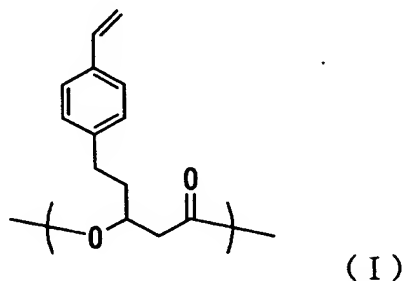


で示される 5 - ( 4 - ビニルフェニル ) 吉草酸を原料とし、  
前記化学式 (III) の化合物を含む培地中で、ポリヒドロキシアルカノエートの  
産生能を有する微生物を培養して、

下記化学式 (I) :

【 0 0 3 0 】

【化 8】



で示される 3 - ヒドロキシ - 5 - ( 4 - ビニルフェニル ) 吉草酸ユニットを含む  
ポリエステルを前記微生物に産生させることを特徴とするポリエステルの生産方  
法である。

【 0 0 3 1 】

本発明のポリエステルの生産方法においては、前記化学式 (III) の化合物に  
加えて、ペプチド類をも含む培地中で、前記微生物を培養することを特徴とする  
ポリエステルの生産方法とすることができる。その際、培地中に含める前記ペプ  
チド類として、ポリペプトンを用いることを特徴とするポリエステルの生産方法  
とすることが好ましい。

## 【 0 0 3 2 】

また、本発明のポリエステルの生産方法においては、前記化学式 (III) の化合物に加えて、有機酸をも含む培地中で、前記微生物を培養することを特徴とするポリエステルの生産方法とすることができる。その際、例えば、培地中に含める前記有機酸として、ピルビン酸、オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸、ならびにこれら有機酸の塩からなる群より選択される 1 つ以上の有機酸またはその塩を用いることを特徴とするポリエステルの生産方法とすることが好ましい。

## 【 0 0 3 3 】

同様に、本発明のポリエステルの生産方法においては、前記化学式 (III) の化合物に加えて、アミノ酸をも含む培地中で、前記微生物を培養することを特徴とするポリエステルの生産方法とすることができる。その際、例えば、培地中に含める前記アミノ酸として、グルタミン酸、アスパラギン酸、ならびにこれらアミノ酸の塩からなる群より選択される 1 つ以上のアミノ酸またはその塩を用いることを特徴とするポリエステルの生産方法とすることが好ましい。

## 【 0 0 3 4 】

さらには、本発明のポリエステルの生産方法においては、前記化学式 (III) の化合物に加えて、糖類をも含む培地中で、前記微生物を培養することを特徴とするポリエステルの生産方法とすることもできる。その際、例えば、培地中に含める前記糖類として、グルコース、フルクトース、マンノース、マルトース、セロビオース、ラクトース、スクロースからなる群より選択される 1 つ以上の選ばれる 1 つ以上の糖類を用いることを特徴とするポリエステルの生産方法とすることが好ましい。

## 【 0 0 3 5 】

上記の構成を有する本発明のポリエステルの生産方法では、前記化学式 (III) の化合物を含む培地中で、前記微生物を培養し、前記微生物が産生した前記化学式 (I) で示される 3 - ヒドロキシ - 5 - ( 4 - ビニルフェニル ) 吉草酸ユニットを含むポリエステルを微生物細胞から回収する工程を有することを特徴とするポリエステルの生産方法とするのが一般的である。



【0036】

なお、本発明のポリエステルの生産方法では、前記微生物として、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物を用いることを特徴とするポリエステルの生産方法とすることが好ましい。例えば、その際、前記微生物として、シュードモナス・チコリアイ YN2 株 (*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM BP-7375) を用いることを特徴とするポリエステルの生産方法とするとより好ましいものとなる。

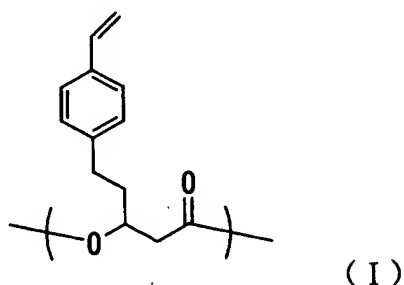
【0037】

## 【発明の実施の形態】

本発明は、側鎖に、その環上にビニル基が置換している芳香環を有している PHA 型の新規なポリエステルとして、下で述べる微生物を利用する生産方法によって生産可能な、下記化学式 (I) :

【0038】

【化9】



で示される 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットを含むポリエステルを提供している。この 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットには、付加反応などにおける、反応性が高く、様々な官能基の導入や化学的変換を施すことが可能なビニル基が、芳香環であるフェニル基上、p 位に存在しており、フェニル基の存在によって、融点が高く、加工性も良いという加工特性を有する上に、前記ビニル基を利用して、様々な官能基の導入や化学的変換を施すことで、新規な機能を付与する上でも有用なものとなる。

【0039】

なお、化学式 (I) の 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットを含む PHA 型のポリエステルにおいて、その他のユニットを含むものであってもよく、通常、3-ヒドロキシアルカン酸ユニットをも若干含有する PHA 型のポリエステルであってもよい。但し、化学式 (I) の 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットの含有比率は、少なくとも、1 ユニット%以上、通常は、主成分、すなわち、少なくとも 50 ユニット%以上、できれば、70 ユニット%以上となるものが、フェニル基の存在比率に依存する、融点の高さ、加工性の良さを付与する上では好ましい。

## 【0040】

具体的には、化学式 (I) のユニットの含有比率は、その他のユニットとして、化学式 (II) で示される 3-ヒドロキシアルカン酸ユニットのみを含む PHA である場合には、70%以上であることが望ましい。しかしながら、化学式 (I) のユニット以外のユニットも、同じくフェニル基をその側鎖に有するユニットである際には、それら類似するユニットの含有率の総和が 70%以上となることが望ましい。なお、PHA の用途や、化学式 (I) のユニットの利用目的によっては、必ずしも、高い含有比率を必要としないこともある。ただし、化学式 (I) のユニットの含有比率が、1 ユニット%に満たないものでは、ポリマー全体にかかるユニットが存在することによる特性が発揮されなくなる。

## 【0041】

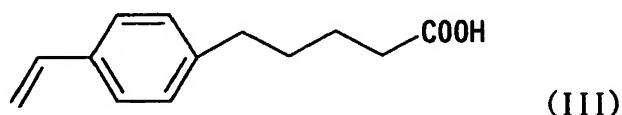
その他の成分として含有される 3-ヒドロキシアルカン酸ユニットは、その側鎖は、炭素数 1~9 の範囲の直鎖アルキル基である、上記の化学式 (II) で示される 3-ヒドロキシアルカン酸ユニットであることが望ましい。この種の 3-ヒドロキシアルカン酸ユニットは、ビニル基のような高い反応性を有していないので、様々な官能基の導入や化学的変換を施す際、不要な反応を起こさず、目的とするビニル基に選択的に反応を起こすことを可能とする。なお、本発明の PHA 型のポリエステルは、溶融成形して、種々の最終製品に加工するが、その分子量が過度に大きいものであると、フェニル基による融点の上昇作用が必要以上に働き、適度な溶融温度範囲を超えてしまうものとなる。その点をも考慮すると、数平均分子量が、3000~100000 の範囲のものは、好適なものとなる。

## 【 0 0 4 2 】

以下に、本発明のポリエステルを製造する方法について、より詳細に説明する。本発明では、上記化学式 (I) の 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットを含む PHA 型のポリエステルを、微生物を利用して、生分解性を有する PHA 型のポリエステルとして生産することができる。具体的には、原料として、下記化学式 (III) :

## 【 0 0 4 3 】

## 【 化 1 0 】



で示される 5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸を用い、PHA 産生能を有する微生物により、対応する化学式 (I) の 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットに変換させ、それを含む PHA 型のポリエステルを生産・蓄積させる。一般に、生産される PHA 型のポリエステルは、側鎖に、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットの 4-ビニルフェニル基など疎水性の原子団を有するので、水溶性は乏しく、菌体内に蓄積されるので、培養により増殖させ、目的の PHA 型のポリエステルを生産・蓄積している菌体を集菌することで、培地と分離が容易になされる。集菌した培養菌体を、洗浄・乾燥した後、目的の PHA 型のポリエステルを溶媒抽出などの手段で、単離することができる。

## 【 0 0 4 4 】

本発明のポリエステルの生産方法で用いる微生物は、PHA 産生能を有する微生物、この場合、化学式 (III) で示される 5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸を含む培地中で培養することにより化学式 (I) で示す 3-ヒドロキシ-5-(

4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットを含むPHA型のポリエステルを生産し得る微生物であれば、いかなる微生物であってもよい。利用可能なPHA産生能を有する微生物の一例としては、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物を挙げることができる。なかでも、PHA産生能を有するものの、フェニル基上に置換しているビニル基に対しては、それを酸化する、あるいは、エポキシ化するなどの酵素反応性を示さない菌株がより好ましいものである。例えば、より好適な菌株として、シュードモナス・チコリアイ YN2株 (*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM BP-7375) を一例として挙げることができる。

## 【0045】

このシュードモナス・チコリアイ YN2株は、本発明者らにより、山梨県の土壌から取得された菌株であり、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所(生命研)に、平成11年6月3日付けで、受託番号: 微工研菌寄第P-17411 (FERM P-17411) の微生物として、既に国内寄託され、その後、平成12年11月20日付けで、前記原寄託よりブタペスト条約に基づく寄託への移管がなされ、同国際寄託機関でもある生命研により、受託番号: FERM BP-7375の微生物として、受託されている。

## 【0046】

なお、このYN2株 (FERM BP-7375) は、以下のような菌学的性質を示す微生物である。

## 【0047】

YN2株の菌学的性質

培養温度	: 30℃
<u>形態学的性質</u>	
細胞形態	: 桿菌(0.8×1.5~2.0 mm)
グラム染色	: 陰性
孢子形成	: 陰性
運動性	: 陽性
コロニー形状	: 円形、全縁なめらか、低凸状、

表層なめらか、光沢、半透明

生理学的性質

カタラーゼ	: 陽性
オキシダーゼ	: 陽性
O/F 試験	: 非発酵性
硝酸還元	: 陰性
インドール産生	: 陽性
ブドウ糖酸性化	: 陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	: 陰性
ウレアーゼ	: 陰性
エスクリン加水分解	: 陰性
ゼラチン加水分解	: 陰性
$\beta$ -ガラクトシダーゼ	: 陰性

基質資化能

ブドウ糖	: 陽性
L-アラビノース	: 陽性
D-マンノース	: 陰性
D-マンニトール	: 陰性
N-アセチル-D-グルコサミン	: 陰性
マルトース	: 陰性
グルコン酸カリウム	: 陽性
n-カプリン酸	: 陽性
アジピン酸	: 陰性
d l-リンゴ酸	: 陽性
クエン酸ナトリウム	: 陽性
酢酸フェニル	: 陽性
King's B 寒天での蛍光色産生	: 陽性
4% NaCl での生育	: 陽性(弱)
ポリ- $\beta$ -ヒドロキシ酪酸の蓄積	: 陰性(*)

Tween 80 の加水分解

: 陽性

\* nutrient agar 培養コロニーをズダンブラックで染色することで判定。

【0048】

以上のような菌学的性質に基づき、バージェーズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー・第1巻 (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1) (1984年) 及びバージェーズ・マニュアル・オブ・ディタミネーティブ・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 第9版 (1994年) を参照して、属種の同定を行ったところ、YN 2株は、シュードモナス チコリアイ (*Pseudomonas cichorii*) と同定するのが適当であることが認められた。加えて、この菌株は、シュードモナス チコリアイ (*Pseudomonas cichorii*) の属種に同定された既知の菌株においては、それまで報告の無い性質を種々有することも判明した。その一つは、例えば、4-シクロヘキシル酪酸を基質として、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを大部分含むポリエステル (PHA) を極めて高収率で生産する能力を示すことなどであるが、この特性などを考慮して、この菌株を新菌株であると判断し、上述するように寄託を行った。

【0049】

なお、本発明のPHA型のポリエステルは、それを構成する化学式 (I) で示される3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニット、また、副次的に含有されるその他のユニット、例えば、化学式 (II) で示される3-ヒドロキシアルカン酸ユニットは、共に、その3位の炭素原子は、不斉炭素となっている。この不斉中心に由来して、互いに絶対配置の異なる立体異性体が存在するものの、生分解性の観点では、含まれる全てのユニットにおいて、その立体異性体がR体となるものが最適である。

【0050】

微生物を利用して、対応するアルカン酸から3-ヒドロキシアルカン酸へと変換しており、本発明の生産方法で得られるPHA型のポリエステルは、全てのユニットにおいてその立体異性体がR体となる特徴を有している。

【0051】

本発明の生産方法では、上記する P H A 産生能を有する微生物を、基質を含む培地中で培養するが、その際、微生物の培養条件は、下記するように選択することが望ましい。

#### 【 0 0 5 2 】

目的とする化学式 (I) で示される 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットを含む P H A 型のポリエステルを生産するための基質、化学式 (III) で示される 5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸を培地に含ませる際、その濃度は、0.01%~1% (w/v) の範囲、好ましくは、0.02%~0.2% (w/v) の範囲に選択することが望ましい。なお、化学式 (I) で示す 3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットの他、それ以外の 3-ヒドロキシアルカン酸型のユニットをも含有する用いる P H A 型のポリエステルを生産させる際には、それ以外の 3-ヒドロキシアルカン酸型のユニットに対応する基質、すなわち、対応するアルカン酸を培地に添加することができる。

#### 【 0 0 5 3 】

また、培地には、微生物の増殖を促す基質として、酵母エキスやポリペプトン、肉エキスといった栄養素を添加することが可能である。すなわち、酵母エキスやポリペプトン、肉エキスといった栄養素の形態で、ペプチド類をエネルギー源、炭素源として、添加することができる。

#### 【 0 0 5 4 】

あるいは、培地には、微生物の増殖により消費されるエネルギー源、炭素源として、糖類、例えば、グルコース、フルクトース、マンノース、マルトース、セロビオース、ラクトース、スクロースなどの水溶性の糖類を添加することができる、一般に、糖類のうち、グルコース等の単糖類を用いることが望ましい。

#### 【 0 0 5 5 】

前記糖類に代えて、有機酸、より具体的には、T C A サイクルに関与する脂肪酸、ならびに、T C A サイクルから 1 段階や 2 段階の少ない生化学的反応により誘導される脂肪酸を利用することができる。有機酸として、例えば、ピルビン酸、オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸などのヒドロキシカルボン酸やオキソカルボン酸類またはそ

の水溶性の塩を用いることが可能である。あるいは、アミノ酸、例えば、アスパラギン酸やグルタミン酸等のアミノ酸またはその塩を用いることが可能である。有機酸またはその塩を添加する際には、ピルビン酸、オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸、ならびにその塩からなる群から、一種または複数種を選択し、培地に添加し、溶解させることがより好ましい。あるいは、アミノ酸またはその塩を添加する際には、アスパラギン酸、グルタミン酸ならびにその塩からなる群から、一種または複数種を選択し、培地に添加し、溶解させることがより好ましい。その際、必要に応じて、全部または一部を水溶性の塩の形状で添加し、培地のpHに影響を与えず、均一に溶解させることもできる。

## 【0056】

微生物の増殖を促す基質として、培地に添加する、ペプチド類、糖類、有機酸またはその塩は、いずれを用いてもよく、二種以上を混用してもよい。なお、培地に対する、その添加量は、通常、0.1%～5% (w/v) の範囲、より好ましくは、0.2%～2%の範囲に選択することが望ましい。有機酸の塩を用いる際には、対応する有機酸に換算した添加量を意味する。二種以上を混用する際には、その添加量の合計を前記の範囲とすることが望ましい。

## 【0057】

本発明で用いる培地としては、リン酸塩、ならびにアンモニウム塩または硝酸塩等の窒素源を含む無機塩培地ならいかなる培地でも利用可能である。なお、培地に含有される、窒素源の濃度を調節することで、PHAの生産性を向上せしめることが可能である。

## 【0058】

培養温度は、利用する菌株に応じて、その菌株が良好に増殖可能な温度であれば、特に問題はないが、通常、20℃～30℃の範囲に選択することが適当である。培養は、液体培地、固体培地を用いる培養など、培地中に基質を保持でき、また、用いる微生物の増殖が可能で、PHAの生産を行うことができる培養形態である限り、いかなる培養方法を用いることができる。さらに、バッチ培養、フェドバッチ培養、半連続培養、連続培養等の種類も問わない。液体バッチ培養の



形態としては、振とうフラスコによって振とうさせて、培地に酸素を供給する方法、ジャー・ファーマンターによる攪拌通気方式の酸素供給方法が好適に利用できる。

## 【 0 0 5 9 】

微生物に P H A を生産・蓄積せしめる手法としては、上述する、所定の濃度で基質を添加した、リン酸塩、ならびにアンモニウム塩または硝酸塩等の窒素源を含む無機塩培地において、微生物を培養する、一段階培養法の他に、培養を二段階に分けて行う二段階培養法を採用することもできる。この二段階培養法では、一次培養として、所定の濃度で基質を添加した、リン酸塩、ならびにアンモニウム塩または硝酸塩等の窒素源を含む無機塩培地において、微生物を一旦十分に増殖させた後、二次培養として、培地に含まれる塩化アンモニウムのような窒素源を制限した上で、所定の濃度で基質を添加した培地に、一次培養で得られた菌体を移し、更に培養して、微生物に P H A を生産・蓄積せしめる。この二段階培養法を採用すると、目的とする P H A の生産性が向上する場合がある。

## 【 0 0 6 0 】

本発明の生産方法では、前記の培養により微生物に P H A を生産・蓄積せしめた後、目的とする P H A を分離・回収する。この培養菌体からの P H A の回収は、通常行われている溶媒抽出、特に、クロロホルム抽出が最も簡便である。抽出溶媒としては、クロロホルム以外に、ジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、アセトン等が用いられる場合もある。また、有機溶媒の使用が制限を受ける環境中では、溶媒抽出に代えて、S D S 等の界面活性剤処理、リゾチーム等の酵素処理、E D T A 等の薬剤処理によって、目的とする P H A 以外の菌体内成分を除去することによって、P H A のみを回収する方法を利用することもできる。

## 【 0 0 6 1 】

本発明の生産方法に利用可能な無機塩培地の一例として、後に述べる実施例において利用している無機塩培地（M 9 培地）の組成を以下に示す。

## 【 0 0 6 2 】

（M 9 培地の組成）

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  : 6.3  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 3.0  
 $\text{NH}_4\text{Cl}$  : 1.0  
 $\text{NaCl}$  : 0.5 g/L、

pH = 7.0

更には、良好な菌体の増殖、それに伴うPHAの生産性の向上を図るためには、前記M9培地などの無機塩培地に対して、以下に組成を示す微量成分溶液を0.3% (v/v) 程度添加する必要がある。かかる微量成分溶液の添加は、微生物の増殖に際して使用される微量金属元素などを供給するものである。

#### 【0063】

(微量成分溶液の組成)

ニトリロ 三酢酸 : 1.5 ;

$\text{MgSO}_4$  : 3.0 ;  $\text{MnSO}_4$  : 0.5 ;  $\text{NaCl}$  : 1.0 ;

$\text{FeSO}_4$  : 0.1 ;  $\text{CaCl}_2$  : 0.1 ;  $\text{CoCl}_2$  : 0.1 ;

$\text{ZnSO}_4$  : 0.1 ;  $\text{CuSO}_4$  : 0.1 ;  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  : 0.1 ;

$\text{H}_3\text{BO}_3$  : 0.1 ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  : 0.1 ;  $\text{NiCl}_2$  : 0.1 g/L

#### 【0064】

#### 【実施例】

以下に、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。これら実施例は、本発明の最良の実施の形態の一例ではあるものの、本発明は、かかる実施例により限定を受けるものではない。

#### 【0065】

#### (実施例1)

M9培地に、基質と、ペプチド類としてポリペプトンを添加し、一段階培養法を適用して、微生物を培養して、PHAの生産を行わせた。

#### 【0066】

500 mL容振とうフラスコを用いて、ポリペプトン0.5%及び5-(4-ビニルフェニル)吉草酸0.05%を含むM9培地200 mLに、予め寒天プレート上で種菌培養したYN2株のコロニーを植菌し、30℃、48時間培養

を行った。培養後、遠心分離により培養菌体を集菌し、メタノールで洗浄した。凍結乾燥した後、乾燥菌体重量を秤量した。

## 【0067】

乾燥菌体に、クロロホルムを加え、40℃で24時間ポリマーを抽出した。抽出後の破碎菌体を除去するため、ポリマーが抽出されたクロロホルムをろ過した。ポリマーの溶解するクロロホルム層を、エバポレーターにより濃縮した後、冷メタノールで沈澱固化した部分を回収した。回収された沈澱物を減圧乾燥して、目的とするポリマーを得た。乾燥菌体の重量は139 mg、得られたポリマーの重量（回収量）は22 mgであった。

## 【0068】

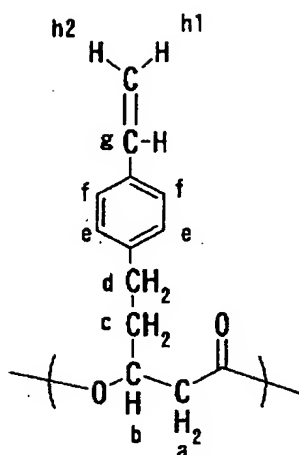
得られたポリマーの平均分子量は、ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー（GPC）により測定した（東ソー HLC-8220 GPC、カラム：東ソー TSK-GEL Super HM-H、溶媒：クロロホルム、ポリスチレン換算）。その結果、得られたポリマーは、数平均分子量  $M_n = 3700$ 、重量平均分子量  $M_w = 8900$  であった。

## 【0069】

得られたポリマーの構造決定は、 $^1\text{H}$ -NMR（FT-NMR：Bruker DPX400；共鳴周波数：400MHz；測定核種： $^1\text{H}$ ；使用溶媒： $\text{CDCl}_3$ ；reference：キャピラリ封入TMS/ $\text{CDCl}_3$ ；測定温度：室温）によって行った。図1に、 $^1\text{H}$ -NMRスペクトルチャートを示す。また、図1に示す $^1\text{H}$ -NMRスペクトルの各共鳴シグナルを与える水素原子の帰属を、表1（ $^1\text{H}$ -NMR）に示す。

## 【0070】

【表 1】

 $^1\text{H}$ -NMR 帰属結果

ppm	積分値	分裂	帰属
1.82~1.86	2H	m	c
2.40~2.64	4H	m	a, d
5.14~5.28	2H	m	b, h1
5.62~5.67	1H	d	h2
6.58~6.66	1H	t	g
7.03~7.05	2H	d	e
7.24~7.26	2H	d	f

$^1\text{H}$ -NMRの帰属の結果、図1に示される各シグナルは、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットに由来することが確認された。また、得られたPHAは、主構成ユニットとして、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットを含み、その含有率は、少なくとも73ユニット%以上であることが示された。なお、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニット以外の含まれるユニットは、芳香環（ベンゼン環）を有してなく、化学式(III)で示すことができる3-ヒドロシアルカン酸ユニットと推定される。

【0071】

(実施例2)

M9培地に、基質と、糖類としてグルコースを添加し、二段階培養法を適用し

て、微生物を培養して、PHAの生産を行わせた。

【0072】

500 mL容振とうフラスコを用いて、グルコース0.5%及び5-(4-ビニルフェニル)吉草酸0.05%を含むM9培地200 mLに、予め寒天プレート上で種菌培養したYN2株のコロニーを植菌し、30℃、48時間一次培養を行った。培養後、遠心分離により培養菌体を集菌した。

【0073】

次いで、500 mL容振とうフラスコを用いて、窒素源の $\text{NH}_4\text{Cl}$ 成分を含まないM9培地に対して、グルコース0.5%及び5-(4-ビニルフェニル)吉草酸0.05%を添加して調製した培地200 mLに前記菌体を移し、30℃、48時間二次培養を行った。培養後、遠心分離により培養菌体を集菌し、メタノールで洗浄した。凍結乾燥した後、乾燥菌体重量を秤量した。

【0074】

乾燥菌体に、クロロホルムを加え、40℃で24時間ポリマーを抽出した。抽出後の破碎菌体を除去するため、ポリマーが抽出されたクロロホルムをろ過した。ポリマーの溶解するクロロホルム層を、エバポレーターにより濃縮した後、冷メタノールで沈澱固化した部分を回収した。回収された沈澱物を減圧乾燥して、目的とするポリマーを得た。乾燥菌体の重量は203 mg、得られたポリマーの重量（回収量）は17 mgであった。

【0075】

得られたポリマーの平均分子量は、ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー（GPC）により測定した（東ソー HLC-8220 GPC、カラム：東ソー TSK-GEL Super HM-H、溶媒：クロロホルム、ポリスチレン換算）。その結果、得られたポリマーは、数平均分子量  $M_n = 8100$ 、重量平均分子量  $M_w = 17000$ であった。

【0076】

得られたポリマーの構造決定は、 $^1\text{H}$ -NMR（FT-NMR：Bruker DPX400；共鳴周波数：400MHz；測定核種： $^1\text{H}$ ；使用溶媒： $\text{CDCl}_3$ ；reference：キャピラリ封入TMS/ $\text{CDCl}_3$ ；測定温度：室温）によって行った。そ

の結果、上記実施例 1 に記載する $^1\text{H}$ -NMR シグナルに相当するスペクトルが観測され、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットを主構成ユニットとする PHA であることが判明した。また、その強度から、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットの含有比率は、少なくとも 97 ユニット%以上であることが示された。

## 【0077】

## (実施例 3)

M9 培地に、基質と、有機酸としてピルビン酸ナトリウムを添加し、二段階培養法を適用して、微生物を培養して、PHA の生産を行わせた。

## 【0078】

実施例 2 で利用したグルコースに代えて、有機酸の一つであるピルビン酸ナトリウムを用い、培地に 0.5% 添加し、この変更点以外の条件は、実施例 2 と同様にして、菌体を培養して、PHA を生産させた。なお、ピルビン酸は、グルコースの解糖系（または糖新生系）の経路に含まれる  $\alpha$ -オキソカルボン酸である。また、乾燥菌体とした後、同じ手順・条件で、ポリマーを回収した。乾燥菌体の重量は 145 mg、得られたポリマーの重量（回収量）は 29 mg であった。

## 【0079】

得られたポリマーの平均分子量は、ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー (GPC) により測定した（東ソー HLC-8220 GPC、カラム：東ソー TSK-GEL Super HM-H、溶媒：クロロホルム、ポリスチレン換算）。その結果、得られたポリマーは、数平均分子量  $M_n = 7300$ 、重量平均分子量  $M_w = 16000$  であった。

## 【0080】

得られたポリマーの構造決定は、 $^1\text{H}$ -NMR (FT-NMR: Bruker DPX400; 共鳴周波数: 400MHz; 測定核種:  $^1\text{H}$ ; 使用溶媒:  $\text{CDCl}_3$ ; reference: キャピラリー封入 TMS/ $\text{CDCl}_3$ ; 測定温度: 室温) によって行った。その結果、上記実施例 1 に記載する $^1\text{H}$ -NMR シグナルに相当するスペクトルが観測され、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル) 吉草酸ユニットを主構

成ユニットとするPHAであることが判明した。また、その強度から、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットの含有比率は、少なくとも99ユニット%以上であることが示された。

【0081】

【発明の効果】

本発明のポリエステルは、上記する化学式(I)で示される3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットを含むPHA型のポリエステルであり、かかる側鎖に、ビニル基をその環上に置換基として有するベンゼン環を有しているPHA型のポリエステルは、従来報告されていないものである。本発明では、この新規な構成を有するPHA型のポリエステルを、基質として、対応する(4-ビニルフェニル)吉草酸を用い、微生物により生分解性のPHA型のポリエステルとして生産させることを可能としている。かかる微生物により生産される、化学式(I)で示される3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットを含むPHA型のポリエステルは、その他に若干含有される他の3-ヒドロキシアルカン酸ユニットを含め、その3位の不斉炭素における立体配置は、全てR体のものとなっており、立体異性の乱れによる加工性の低下もなく、生分解性を有する有用な材料となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

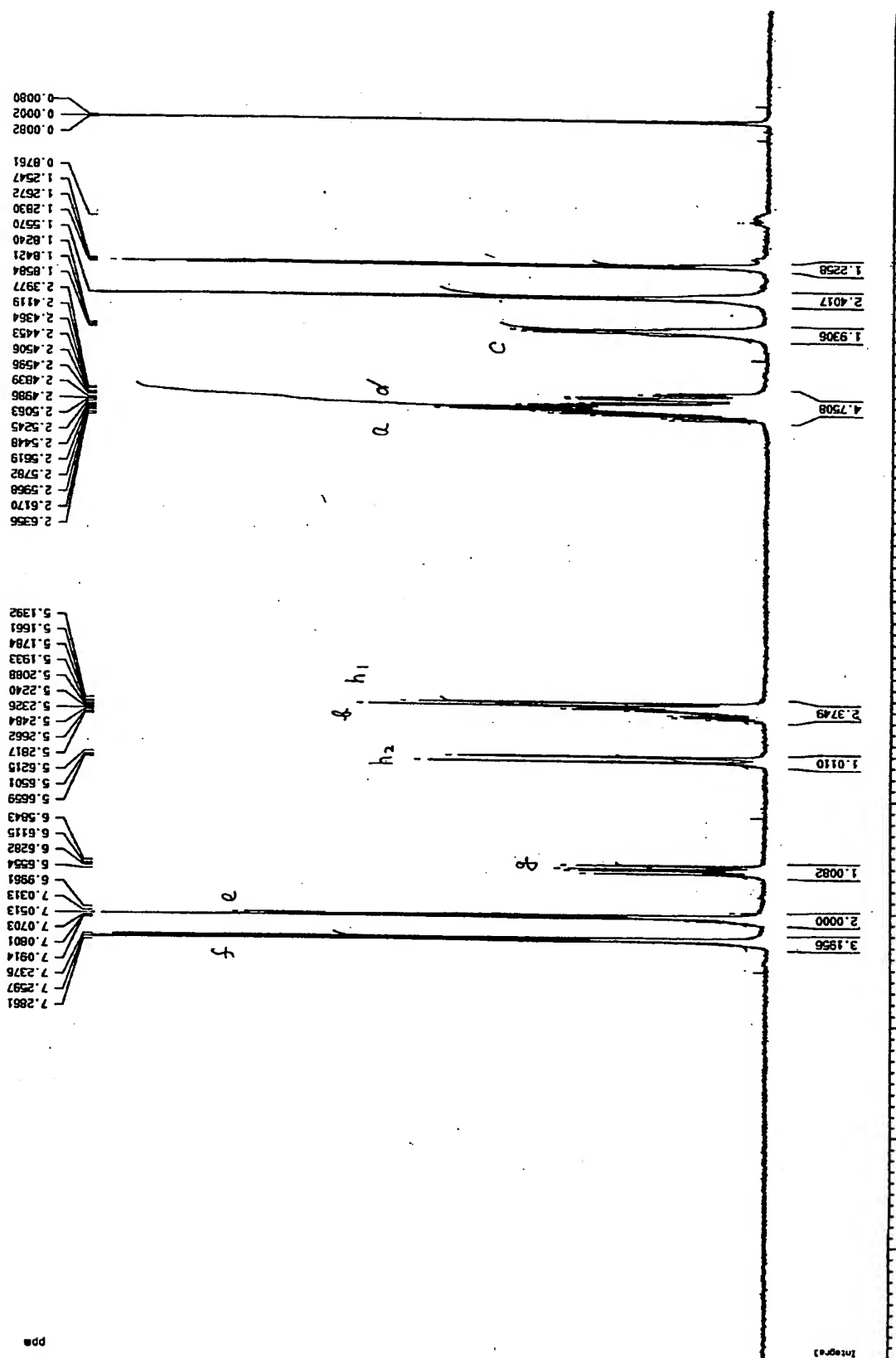
実施例1で取得されたPHAポリマーの $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す。

【書類名】

図面



【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 側鎖上に芳香環及びビニル基を有するポリエステル、特に、生分解性を有する P H A 型の新規なポリエステルと、その生産方法の提供。

【解決手段】 直鎖アルカン酸を基質として、対応する 3 - ヒドロキシアルカン酸ユニットを含む P H A の産生能を有する微生物を用い、基質の 5 - ( 4 - ビニルフェニル ) 吉草酸を含む無機塩培地で培養して、この基質 5 - ( 4 - ビニルフェニル ) 吉草酸に存在するビニル基を保持しつつ、その吉草酸骨格の 3 位にヒドロキシ基の導入がなされた、3 - ヒドロキシ - 5 - ( 4 - ビニルフェニル ) 吉草酸ユニットを含む P H A 型ポリエステルを生産する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001007]

1. 変更年月日	1990年 8月30日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都大田区下丸子3丁目30番2号
氏 名	キヤノン株式会社